

Actividad biológica de la fracción no polar de semillas de *crotalaria pallida* sobre el modelo *drosophila melanogaster*

Biological activity of the non polar fraction from the seeds of *crotalaria pallida* through *drosophila melanogaster* model

Gian Carlo Peñalosa-Atuesta^I, Carlos Alberto Peláez-Jaramillo.^{II}

Resumen: En este trabajo se presenta la evaluación de la bioactividad de la fracción no polar obtenida de las semillas de *Crotalaria pallida* Aiton sobre el modelo biológico *Drosophila melanogaster* Canton. La evaluación del ciclo de vida del modelo biológico permitió determinar que existe actividad inhibitoria sobre sus estados inmaduros, evidenciada con la disminución de la relación pupa/huevo de los tratamientos frente a controles no tratados. El uso de diferentes ensayos de RMN y del modelo biológico, permitió establecer la identidad de los compuestos responsables de la actividad inhibitoria observada y con el uso de cromatografía gaseosa (GC-FID) se corroboró la identidad de los compuestos purificados al compararlos con estándares de metil esteres de ácidos grasos (FAMES); adicionalmente, la técnica cromatográfica permitió establecer que existe diferencia en la composición porcentual relativa de los ácidos grasos extraídos de larvas de finales de tercer estadio, expuestas a alimento mezclado con la mezcla de ácidos grasos purificados, comparadas con larvas sin tratamiento y del mismo estadio.

Palabras clave: Ácidos grasos, *Drosophila melanogaster*, cromatografía gaseosa, relación pupa/huevo.

Abstract: The bioactivity evaluation of non polar extracts obtained from the seeds of *Crotalaria pallida* Aiton through the biological model *Drosophila melanogaster* Canton was studied. With the lifecycle assessment of the biological model, the inhibitory activity in the immature stages was determined. This activity was evidenced by the decrease in the pupa-egg relationship of the treatments compared to the untreated

I Químico, MSc.; Docente-Investigador, Universidad del Tolima, Ibagué - Colombia, correo electrónico: gcpenalozaa@ut.edu.co

II Biólogo, MSc., Ph.D.; Docente-Investigador, Universidad de Antioquia, Medellín – Colombia

controls. The use of different NMR tests and the biological model allowed establishing the identity of the responsible compounds for the observed inhibitory activity. The identity of the purified compounds, compared to standard of fatty acid methyl esters (FAMES), was confirmed by gas chromatography (GC-FID).

Additionally, the difference in the relative percentage composition of fatty acids extracted from larvae of late third-stage exposed to food mixed with the purified compound compared to control larvae of the same stage was evidenced through chromatographic technique.

Keywords: Fatty acids, *Drosophila melanogaster*, gas chromatography, ratio pupae/egg.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Crotalaria* (familia Leguminosae) incluye cerca de 600 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales (Flores, Tozzi, & Trigo, 2009) alrededor del mundo, la mayoría de ellas son potenciales fijadoras de nitrógeno atmosférico, tienen alto valor como forraje y abono verde, lo que les permite fortalecer la aptitud agrícola de los suelos (Ko et al., 2004); el género es considerado la principal fuente de alcaloides pirrolizidínicos (PAs, por sus siglas en inglés), metabolitos ampliamente reconocidos por sus efectos toxicológicos en humanos y animales, que van desde daño hepático hasta la aparición de cáncer en animales sometidos al consumo de altas dosis de plantas que los contienen (Asres, Sporer & Wink, 2004; Devendra, Srinivas & Solmon, 2012; Prakash, Pereira, Reilly & Seawright, 1999; Wink & Mohamed, 2003; Xia, Yan, Chou & Fu, 2008) {“id” : “ITEM-3”, “itemData” : { “DOI” : “10.1016/S1995-7645(11; en Colombia se han reportado cerca de diecinueve especies, algunas de las cuales son usadas en medicina tradicional (Bernal M H Y,1986).

El análisis fitoquímico de innumerables miembros de esta especie, ha permitido el reporte de una vasta y diversa lista de metabolitos secundarios, adicionalmente a los alcaloides pirrolizidínicos, entre los que se pueden mencionar aminas, flavonoides, cumarinas y lectinas (Devendra et al., 2012; Wink & Mohamed, 2003) antibacterial and antioxidant activities of petroleum ether, chloroform, ethanol, and aqueous extracts of in vitro propagated plants and field grown plants of *Crotalaria* sps., for against five human pathogens.\\n\\nMETHODS: The preliminary phytochemistry, antimicrobial and antioxidant activities were evaluated using disc diffusion and DPPH radical scavenging methods.\\n\\nRESULTS: The ethanolic extract of in vitro raised *Crotalaria retusa* (*C. retusa* .

En este trabajo se reporta el aislamiento de los compuestos purificados de la fracción no polar de semillas de *C. pallida* con actividad inhibitoria sobre el ciclo de vida de *D. melanogaster*; la identificación estructural realizada utilizando técnicas espectrofotométricas (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C), acompañada del análisis cromatográfico (GC-FID) permitió evidenciar la presencia de una mezcla de triacil gliceroles como los compuestos con actividad promisorio.

2. METODOLOGÍA

2.1 Obtención del material vegetal

La recolección de la especie *C. pallida* se realizó en el municipio de Girardota, departamento de Antioquia, Colombia, a una altura de 1300 m.s.n.m con una temperatura promedio de 22 °C (6°22'54.4"N 75°26'51.5"W). El espécimen se encuentra depositado bajo el baucher N° HUA 157910, en el herbario de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Antioquia.

2.2 Preparación del material vegetal

Las semillas se secaron a temperatura ambiente durante 48 horas, posteriormente se molieron en un molino marca CONDUX-WERK® modelo LV15M, el material homogeneizado se extrajo con éter de petróleo (fracción 45–60°C), en un sistema Soxhlet, se concentró por rotaevaporación usando un equipo marca BÜCHI® modelo RE 111. El extracto se emulsificó utilizando el tensoactivo TWEEN-80 (Polioxietileno sorbitano monooleato), con el objetivo de garantizar su solubilidad en el alimento de *D. melanogaster*, para lo cual se adicionó 7% (v/v) del tensoactivo a una mezcla agua/extracto; posteriormente se sometió la mezcla a la acción mecánica para disminuir el tamaño de partícula y homogeneizar la mezcla. Las pruebas de bioactividad dirigida se realizaron por ingestión del alimento mezclado con el extracto emulsificado, con esta metodología se evaluó el ciclo de vida del insecto.

2.2.1 Colonias de *Drosophila melanogaster* (CEPA CANTON)

La colonia de *Drosophila melanogaster* (Canton), genéticamente estable, se obtuvo del laboratorio del Grupo Interdisciplinario de Estudios Moleculares (GIEM) del Instituto de Química de la Universidad de Antioquia (laboratorio 2-231) donde se han mantenido a una temperatura promedio de 23 °C, con una humedad relativa del 65% y un fotoperiodo de 12 horas por más de 600 generaciones.

2.2.2 Bioactividad dirigida: Interrupción del ciclo de vida

Con el fin de evaluar la bioactividad del extracto total y para obtener información del comportamiento del modelo en un extenso intervalo de concentraciones se seleccionó un intervalo entre 0.0 (control) y 10000 ppm, en este intervalo se prepararon seis (6) concentraciones diferentes. El ensayo se realizó en viales de vidrio (5 cm de ancho X 10 cm de alto, con un volumen aproximado de 50 mL), en los cuales se depositó el volumen de extracto correspondiente a cada concentración y se completó a un volumen final de 15 mL con el alimento para *D. melanogaster*, que se preparó con 450 mL de agua, 7.0 g de agar, 50.0 g de harina de maíz, 15.0 g de levadura, 40 mL de melaza y 2.5 mL de ácido propiónico. Los viales se dejaron en reposo por 12 horas antes de realizar el cruce de los individuos. En cada vial se depositaron tres parejas de individuos jóvenes, de cuatro días de edad. El tiempo de cruce varió con el objeto del análisis. Para realizar el recuento de huevos las parejas se cruzaron durante 24 horas. Para la evaluación del ciclo de vida completo los individuos se cruzaron por 48 horas.

2.2.3 Métil ésteres de ácidos grasos

La preparación de los métil ésteres de ácidos grasos (FAMES, por sus siglas en inglés) se realizó en el principio activo purificado de la fracción no polar, con el objetivo de confirmar su identidad química y en larvas de finales del tercer instar tratadas con dicho principio activo con el objetivo de analizar el efecto sobre el modelo biológico; también se prepararon para larvas del control.

Para la mezcla de ácidos grasos aislada como el principio activo de la fracción no polar se tomó un peso de 0.170 g de esta muestra, se adicionaron 4.0 mL de NaOH en metanol, se llevó a reflujo en un baño maría a 90 °C durante 7.0 min; transcurrido este tiempo se adicionaron 5.0 mL de BF₃ al 12% en metanol, y se dejó en reflujo por otro dos (2) minutos, posteriormente se adicionaron 4.0 mL de heptano grado HPLC y se dejó en reflujo por un (1) minuto más. La solución se enfrió y se adicionaron 100.0 mL de solución saturada de NaCl. La fase superior (orgánica) se separó y se le adicionó sulfato de sodio anhidro, posteriormente se realizó la inyección de las muestras en un cromatógrafo de gases marca Agilent® 6890 equipado con detector de ionización de llama (FID), bajo las condiciones cromatográficas que se describen en el apartado correspondiente.

2.2.3.1 Métil ésteres de ácidos grasos en larvas de finales de tercer instar

La evaluación de métil ésteres de ácido grasos en larvas se realizó con individuos del tratamiento a 10000 ppm y del control, se usaron los individuos de la concentración

más alta pues fue la que mostró mayor actividad inhibitoria, a los dos grupos de individuos se les realizó una limpieza con 3.0 mL de heptano grado HPLC se secaron a temperatura ambiente y se maceraron para tomar 0.0306 g de larvas tratadas y 0.0326 g de larvas del control, cada una de las muestras se sometió al proceso de derivatización descrito anteriormente, y posteriormente se analizaron por cromatografía de gases.

2.2.4 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo Agilent® 6890, con detector de ionización de llama (FID), auto inyector Agilent® 7683 y una columna DB-23 capilar de 50.0 m., diámetro interno 0.25 mm., espesor de película 1.4µm. Se inyectó 1.0 µL en todos los casos; la temperatura del inyector fue de 220 °C, la temperatura del detector fue de 240 °C, la velocidad promedio del gas portador (H₂) fue de 40.0 cm/s, con una presión de columna de 23.04 psi. La mezcla de gases en el detector fue: Flujo de hidrógeno: 45 mL/min, flujo de aire: 450 mL/min, se utilizó como gas makeup (N₂) con un flujo de 45 mL/min, se utilizó una relación de Split 50:1 en un corrido con rampas temperatura: Temperatura inicial de la columna: 200 °C (isoterma por 10 min) se eleva la temperatura hasta 220 °C con una rata de 2.0 °C/min (isoterma por 4.0 min).

2.2.5 Separación por cromatografía en columna y TLC

El extracto se concentró en rotaevaporador y se sometió a fraccionamiento por cromatografía en columna, utilizando una columna de vidrio (3.0 cm diámetro X 50 cm de largo) empacada con sílica gel 60 (MERCK . Kieselgel 60G, Art. 7731) como fase estacionaria, se utilizaron mezclas con diferentes proporciones de éter de petróleo (45-60 °C) y acetato de etilo (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100, 100 mL de cada mezcla); de este procedimiento se obtuvieron 32 fracciones que con la ayuda de TLC se redujeron a cinco (5); los análisis por cromatografía en capa fina (TLC) fueron realizados sobre placas de sílica gel 60 unida a aluminio (MERCK 5554) y se revelaron en una cámara con yodo. Posteriormente se evaluó la bioactividad de cada una de las fracciones y se realizó el análisis estructural por RMN al compuesto purificado de la fracción 2 (R_f= 1.2), que presentó bioactividad inhibitoria promisoría sobre el modelo biológico.

2.2.6 Identificación de los metabolitos

La identificación del principio activo purificado, se realizó mediante espectrofotometría de resonancia magnética nuclear, en un equipo marca BRUKER® AMX 300,

con 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C , se realizaron ensayos 1-D ^{13}C , 1-D ^1H . Los espectros fueron tomados en DMSO- d_6 a 25 °C, usando TMS como estándar interno.

2.3 Análisis de resultados

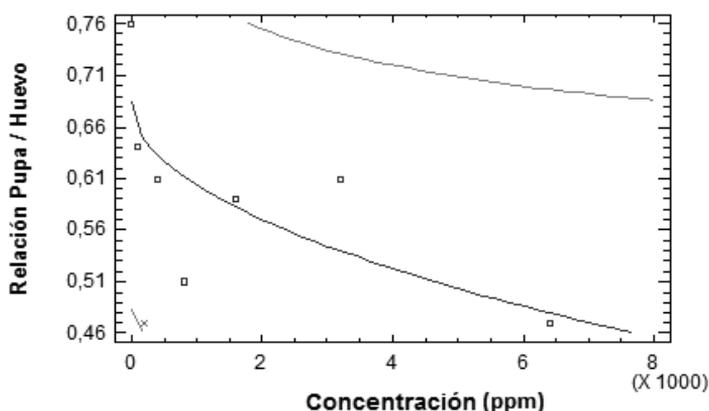
Todos los experimentos fueron hechos con tres repeticiones independientes. Se realizaron los análisis de regresión para las variables número de individuos y la concentración de los extractos, Anova entre ensayos con el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV. Los análisis de regresión fueron realizados a un nivel de significancia del 0,05.

3. RESULTADOS

3.1 Extracto total no polar y fracción purificada

La fracción del desengrase con éter de petróleo se sometió a fraccionamiento en columna; en este proceso se obtuvieron 32 fracciones que al ser evaluadas por TLC se redujeron a cinco (5) según los R_f de los compuestos eluidos. El ensayo bioguiado sobre *D. melanogaster* realizado con el extracto total permitió establecer que la actividad inhibitoria de este no se ejerce sobre la oviposición del modelo biológico (no se muestran los resultados), pero existe una evidente disminución del número de pupas de los tratamientos comparadas con el control; se evidencia que existe una disminución significativa en la relación pupa/huevo y que es dependiente de la concentración; los resultados de este ensayo se muestran en el gráfico N°1.

Gráfico N° 1. Relación pupa/huevo (R P/H) de *D. melanogaster* causada por el extracto total de éter de petróleo de semillas de *C. pallida*

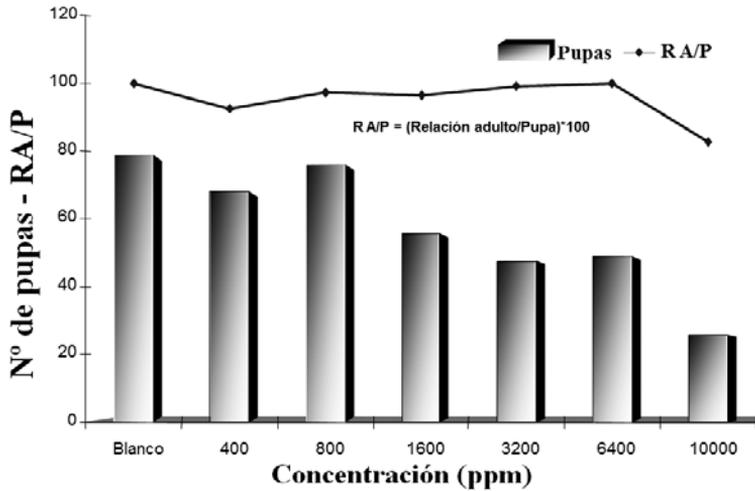


Con este análisis de regresión se obtiene el modelo matemático que representa la correlación de las variables dosis-respuesta (Relación pupa/huevo= $0,684574 - 0,00256339 * \text{sqrt}(\text{Concentración})$), pudiéndose establecer que hay actividad promisorio del extracto total no polar de semillas de *C. pallida* que inhibe el ciclo de vida de *D. melanogaster* ya que existe significancia estadística entre las variables relacionadas en el modelo con un valor p inferior a 0,05 (0,0471); con base en los resultados de este ensayo bioguiado, se realizaron los análisis de actividad biológica de las cinco (5) fracciones obtenidas.

Estos ensayos bioguiados sobre el ciclo de vida del modelo, recuento de individuos inmaduros (huevos y pupas) y de adultos, permitieron establecer que la fracción N° 2 mantiene la actividad inhibitoria observada. En el gráfico N° 2 se presenta la evidencia experimental de este hecho. Adicionalmente se observó que no existe actividad inhibitoria causada por esta fracción sobre la oviposición, ya que el análisis de significancia del modelo de correlación de las variables dosis-respuesta arrojó un valor p superior a 0.05 (0.7370) como se muestra en la tabla N°2, es decir, para el intervalo de concentraciones evaluado el número de huevos en los tratamientos permanece aproximadamente constante y cercano a los controles del ensayo.

La relación adulto/pupa (R A/P) tampoco guarda una relación estadísticamente significativa con las concentraciones evaluadas, en el gráfico N°2 se puede observar que esta relación permanece prácticamente invariable para este intervalo de concentraciones, es decir los individuos que llegan al estado pupa eclosionan al estado adulto casi en su totalidad salvo las pérdidas que son inherentes al modelo.

Gráfico N° 2. Bioactividad sobre estados inmaduros y relación Adulto/pupa (R A/P) de *D. melanogaster* causada por la fracción N°2 del extracto de éter de petróleo de semillas de *C. pallida*



El resultado del ensayo bioguiado, que se resume en el gráfico N°2, evidencia que a partir de 1600 ppm se causa la disminución del número de pupas de los tratamientos comparados con el control del ensayo. En el gráfico N°3 se presenta el análisis estadístico para la correlación de las variables número de pupas y concentración, este análisis estableció que existe significancia estadística entre las variables dosis-respuesta a un nivel de confianza del 95% ya que el valor p es inferior a 0.05 (0.0017), como se muestra en el análisis de los modelos de regresión presentado en la tabla N°1.

Gráfico N° 3. Análisis de varianza para la bioactividad de la fracción N°2 de semillas de *C. pallida* sobre los estados inmaduros (pupa) de *D. melanogaster*

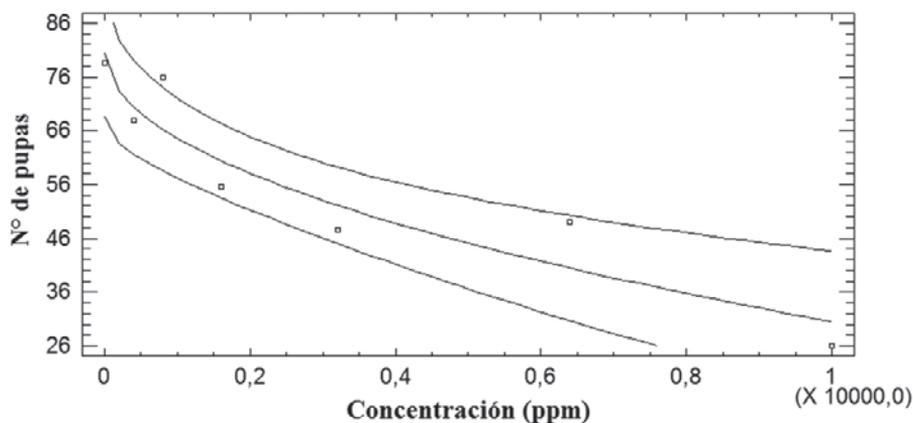
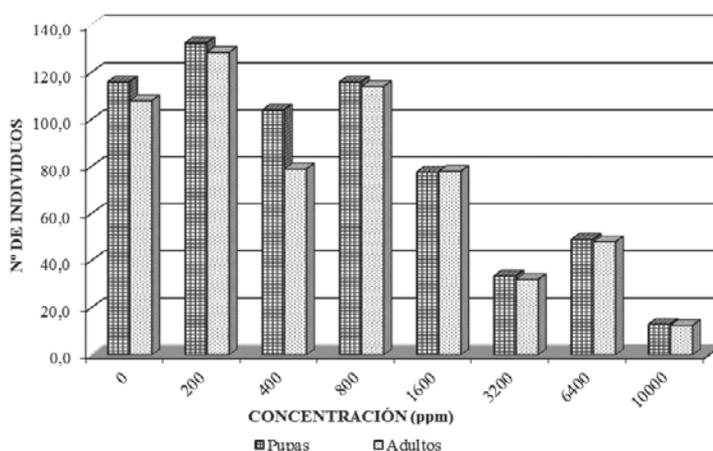


Tabla N°1. Modelos de regresión para la actividad bioguiada de la fracción N°2 de semillas de *C. pallida* sobre *D. melanogaster*

Actividad	Parámetros del modelo	p-valor
Huevo	Huevos= 110,766 + 0,000389749 * Concentración	0,7370
Adulto/pupa	Relación Adulto/pupa= 100,582– 0,00127703*Concentración	0,0924
Pupas	Pupas= 80,3384 – 0,498283*sqrt (Concentración)	0,0017

La fracción N°2 se sometió a separación por cromatografía en columna, obteniéndose 4 sub-fracciones; con el uso de TLC (al revelar en cámara de yodo) se observó una señal que corresponde a un compuesto purificado en la sub-fracción 3 y que en el ensayo bioguiado mantiene la actividad inhibitoria observada sobre *D. melanogaster*. En el gráfico N°4 se muestra el resultado del análisis que corrobora la acción biológica de la sub-fracción purificada; es indiscutible que se mantiene la inhibición sobre los estados inmaduros, evidenciada con la disminución del número de pupas de los tratamientos frente al control.

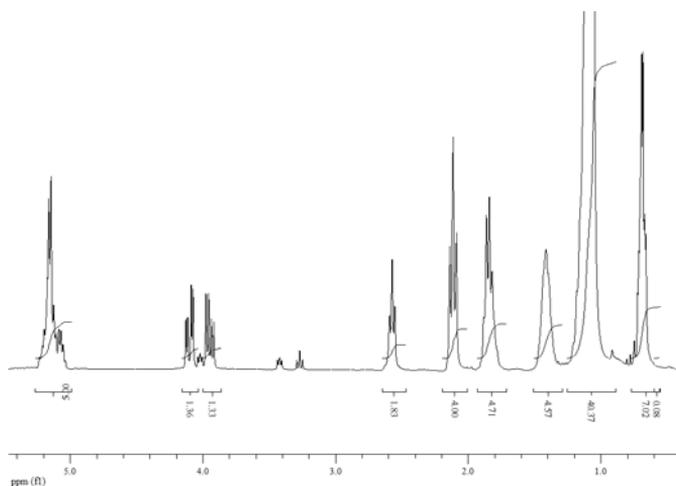
Gráfico N° 4. Bioactividad sobre los estados inmaduros de *D. melanogaster* causada por la sub-fracción purificada de semillas de *C. pallida*



En el ensayo se evidenció que a una concentración de 10000 ppm se causa una inhibición del 91.07 % en el número de pupas presentes en dicho tratamiento con respecto al control. Es indudable también, del gráfico anterior, que la relación Adulto/Pupa no se ve afectada al purificar el compuesto, ya que no se aprecia una tendencia en el comportamiento de esta relación, que se mantiene cercana a la unidad en los tratamientos.

3.2 Análisis estructural de los metabolitos purificados

En el gráfico N°5 se muestra el resultados del análisis de RMN- H^1 en el cual se hace evidente la presencia de una mezcla de ácidos grasos, ya que los desplazamientos químicos para cada señal así lo corroboran, ajustándose a algunos de los reportes que para este análisis se encuentran en la literatura (Aursand, Mabon, & Martin, 2000; Knothe & Kenar, 2004; Sacchi, Addeo, & Paolillo, 1997; Siciliano et al., 2013) linoleic and linolenic acids.

Gráfico N° 5. Espectro de RMN-H¹ de la sub-fracción purificada

Del espectro de RMN-C¹³ (no se muestra) se destaca que no se presenta señal entre 174-176 ppm característica de los ácidos grasos libres, pero aparecen dos señales, la primera a 173.255 ppm y la segunda a 173.683 que son propias de triacilgliceroles, las señales a 62.520 ppm (CH₂O) y a 69.325 ppm (CHO) también son particulares de triacil gliceroles, además se pueden observar cuatro señales entre 128.325 ppm y 130.641 ppm que corresponden a los carbonos C9 y C10 del ácido oleico y a los carbonos C10 y C12 del ácido linoleico (Sacchi et al., 1997).

En el espectro RMN-H¹ que se muestra en gráfico N°5, aparecen señales entre 0.8 y 0.9 ppm que son atribuibles a los protones metílicos del ácido esteárico y del ácido linolénico respectivamente (Siciliano et al., 2013); el multiplete que aparece centrado a 2.10 ppm es atribuible a los protones alílicos del ácido linolénico. La señales que aparecen entre 3.9-4.10 ppm y en 5.10 se atribuyen, respectivamente, a los protones metínicos y metilénicos de la molécula de glicerol; la señal que aparece cerca de 5.20 ppm es atribuible a los protones olefínicos de los ácidos grasos insaturados (Sacchi et al., 1997; Siciliano et al., 2013).

3.3 Análisis cromatográfico

La sub-fracción purificada se analizó por cromatografía de gases, pudiéndose demostrar que realmente se trata de una mezcla de triacilgliceroles, ya que se obtienen las señales correspondientes a seis ácidos grasos diferentes, En el gráfico N° 6a y b

se presenta el resultado del análisis cromatográfico de una mezcla estándar de métil ésteres comparada con esta sub-fracción purificada.

Gráfico N° 6a. Perfil cromatográfico de la mezcla de estándares de métil ésteres

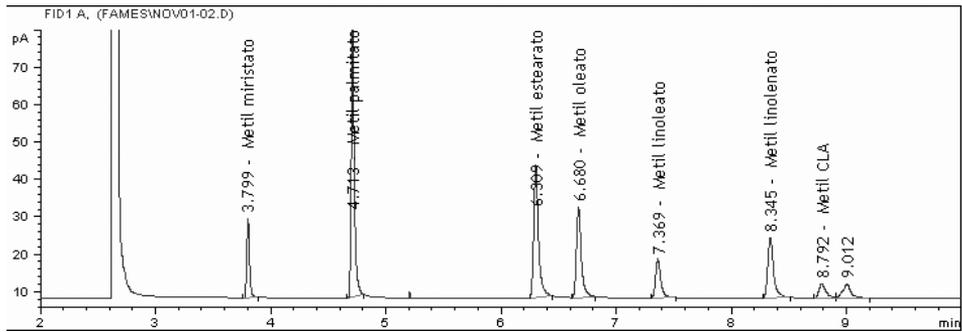
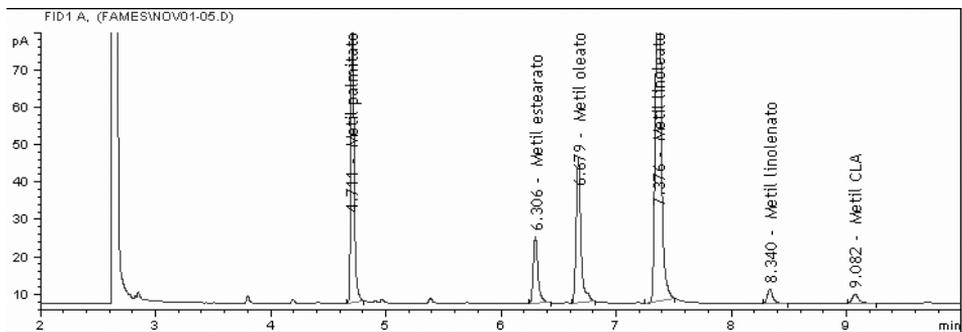


Gráfico N° 6b. Perfil cromatográfico de métil ésteres de ácidos grasos de la sub-fracción purificada de semillas de *C. pallida*



La comparación de estos perfiles cromatográficos permite verificar que la sub-fracción purificada realmente corresponde a una mezcla de triacilglicerolos, vale la pena resaltar la alta composición relativa en ácido linoleico. En la tabla N° 2 se muestra el resultado del análisis de composición relativa de los métil ésteres; el ácido Palmítico (16:0) se muestra como el componente mayoritario (40.69%) situación que se presenta comúnmente en animales y plantas (Huangfu et al., 2013) . La identificación de los métil ésteres se realizó por comparación de los tiempos de retención frente a un patrón analizado bajo las mismas condiciones.

Tabla N° 2. Composición porcentual relativa de métil ésteres de ácidos grasos de la sub-fracción purificada de semillas de *C. pallida*

	Tiempo de retención (min)	Promedio %	Desv. Est
M. Miristato	3.799	0,60	0,02
M. Palmitato	4.713	40,69	0,08
M. Estearato	6.309	5,91	0,01
M. Oleato	6.680	12,41	0,00
M. Linoleato	7.369	38,38	0,10
M. Linolenato	8.345	1,16	0,00
M. CLA	8.712-9.012	0,84	0,00

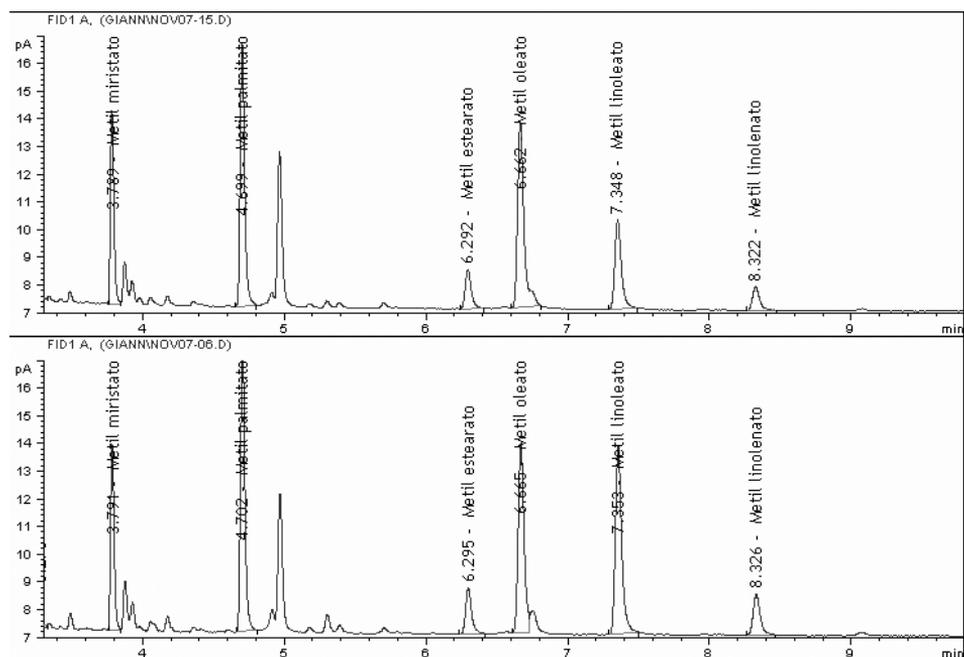
Como se mencionó en el apartado metodológico, se realizó el análisis cromatográfico de la composición de métil ésteres de ácidos grasos a larvas de finales de tercer instar, con el fin de analizar, por lo menos de manera preliminar, si existe algún efecto de los tratamientos sobre la composición de ácidos grasos de estos individuos, comparados con individuos control sin tratamiento; en el gráfico N°7, se muestra el resultado de dicho análisis cromatográfico. La identificación de los metabolitos y el análisis porcentual relativo de los métil ésteres se realizó de la misma manera que para la sub-fracción purificada. La composición porcentual relativa se muestra en la tabla N°3

Tabla N° 3. Composición porcentual relativa de métil ésteres de ácidos grasos obtenidos de larvas de *D. melanogaster*

	Tiempo de retención (min)	Tratamiento 10000 ppm		Larvas Blanco	
		Promedio %	Desv. Est	Promedio %	Desv. Est
M. Miristato	3.789	20,667	0,03	24,221	0,035
M. Palmitato	4.699	31,502	0,01	33,373	0,064
M. Estearato	6.292	5,059	0,02	5,037	0,012
M. Oleato	6.662	19,818	0,04	24,012	0,019
M. Linoleato	7.348	18,816	0,01	10,607	0,003
M. Linolenato	8.322	4,135	0,03	2,750	0,111

El análisis de métil ésteres permite verificar que la constitución de la mezcla de ácidos grasos tanto en el tratamiento como en los individuos del control es la misma, sin embargo al evaluar la composición porcentual relativa de sus constituyentes, se puede advertir que existen diferencias entre los individuos del control y los individuos del tratamiento.

Gráfico N°7. Perfil cromatográfico de métil ésteres: 1. Larvas blanco, 2. Larvas tratamiento 10000 ppm



4. CONCLUSIONES

De manera cualitativa, los resultados de los análisis por RMN- H^1 y la determinación por cromatografía gaseosa de los métil ésteres de ácidos grasos muestran concordancia, pues es posible evidenciar espectrofotométricamente señales de ácidos grasos que después son corroboradas frente a patrones de métil ésteres por GC, particularmente la presencia de ácido linoléico y de ácido esteárico son fácilmente diferenciables por sus desplazamientos químicos característicos en RMN- H^1 .

Por lo menos de manera preliminar, existe concordancia con reportes de la literatura en cuanto al efecto que causa la presencia de ácido esteárico (18:0) en el medio de cultivo de *D. melanogaster*, al disminuir el contenido de ácido palmítico en larvas sometidas a tratamiento frente a larvas control (Geer & Perille, 1977) en un 5.61%. De otro lado la presencia de ácido linoleico (18:2) causa la disminución de ácido oleico (18:1) en un 17.47% (Keith, 1967). Otros ácidos como el mirístico (14:0) disminuye su composición porcentual relativa en un 14.61% frente a las larvas del control. Por el contrario ácidos grasos como el Linoleato (18:2) y el Linolenato (18:3) aumentan su composición relativa en larvas sometidas al tratamiento con la sub-fracción purificada en un 43.63% y en un 33.49% respectivamente.

El análisis cromatográfico (GC) de la sub-fracción purificada (Tabla N° 2) de la fracción no polar obtenida de semillas de *C. pallida*, revela la presencia de ácido palmítico (40.69%), ácido oleico (12.41%), ácido linoleico (38.38%) como los mayores constituyentes de dicha fracción; la mezcla de ácidos grasos se determina como la responsable de la actividad observada, evidenciada con la disminución del número de pupas de los tratamientos, ya que el análisis de los modelos de regresión permite establecer que esta fracción purificada presenta actividad inhibitoria promisorio sobre el modelo *D. melanogaster*.

La actividad biológica de la fracción no polar de semillas de *C. pallida* no afecta la oviposición del insecto y tampoco los estados maduros pero a una concentración de 10000 ppm ejerce una actividad inhibitoria que disminuye en un 91.07% el número de pupas de este tratamiento comparado con el control, esta actividad puede darse en alguno de los pasos huevo-larva o larva-pupa, o bien ejercer su actividad sobre la viabilidad de los huevos, establecer el estadio en el cual se ve afectado el modelo biológico será motivo de posteriores investigaciones.

REFERENCIAS

- Asres, K., Sporer, F., & Wink, M. (2004). Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species, 32, 915–930. <http://doi.org/10.1016/j.bse.2004.03.004>
- Aursand, M., Mabon, F., & Martin, G. J. (2000). Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77(6), 659–666. <http://doi.org/10.1007/s11746-000-0106-5>
- Bernal, H. Y. (1986). Flora de Colombia. 4. *Crotalaria*. Santa Fe de Bogotá: Guadalupe.

- Devendra, B. N., Srinivas, N., & Solmon, K. S. (2012). A comparative pharmacological and phytochemical analysis of in vivo & in vitro propagated *Crotalaria* species. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(1), 37–41. [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60242-3](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60242-3)
- Flores, A. S., Tozzi, A. M. G. D. A., & Trigo, J. R. (2009). Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(4), 459–469. <http://doi.org/10.1016/j.bse.2009.06.001>
- Geer, B. W., & Perille, T. J. (1977). Effects of dietary sucrose and environmental temperature on fatty acid synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry*, 7(4), 371–379. [http://doi.org/10.1016/0020-1790\(77\)90040-3](http://doi.org/10.1016/0020-1790(77)90040-3)
- Huangfu, J., Liu, J., Peng, C., Lee, Y., Wang, M., Jiang, Y., ... Chen, F. (2013). DHA-rich marine microalga *Schizochytrium mangrovei* possesses anti-ageing effects on *Drosophila melanogaster*. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 888–896. <http://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.038>
- Keith, a D. (1967). Fatty acid metabolism in *Drosophila melanogaster*: interaction between dietary fatty acids and de novo synthesis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 21(3), 587–600.
- Knothe, G., & Kenar, J. a. (2004). Determination of the fatty acid profile by 1H-NMR spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(2), 88–96. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200300880>
- Ko, H. H., Weng, J. R., Tsao, L. T., Yen, M. H., Wang, J. P., & Lin, C. N. (2004). Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(4), 1011–1014. <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2003.11.074>
- Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E. B., & Seawright, A. A. (1999). Pyrrolizidine alkaloids in human diet.
- Sacchi, R., Addeo, F., & Paolillo, L. (1997). 1 H and 13 C NMR of Virgin Olive Oil . An Overview, 35, 133–145.
- Siciliano, C., Belsito, E., De Marco, R., Di Gioia, M. L., Leggio, A., & Liguori, A. (2013). Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution 1H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 136(2), 546–554. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.058>
- Wink, M., & Mohamed, G. I. a. (2003). Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: Mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(8), 897–917. [http://doi.org/10.1016/S0305-1978\(03\)00085-1](http://doi.org/10.1016/S0305-1978(03)00085-1)

Xia, Q., Yan, J., Chou, M. W., & Fu, P. P. (2008). Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, heliotrine. *Toxicology Letters*, 178(2), 77–82. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.02.008>

Referencia	Fecha de recepción	Fecha de aprobación
Gian Carlo Peñaloza-Atuesta. Carlos Alberto Peláez-Jaramillo. Actividad Biológica de la fracción no polar de semillas de <i>Crotalaria Pallida</i> sobre el modelo <i>Drosophila melanogaster</i> Revista Tumbaga (2014), 9 vol. II.	Día/mes/año 24/06/2014	Día/mes/año 14/09/2014